As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

SUMÁRIO/CONTENTS

Mem. Inst. Butantan
52 (1): 5-10, 1990

ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS DE BIOTÉRIO PELO CALOR ÚMIDO*

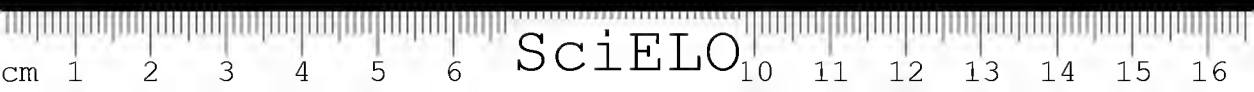
Sueli Blanes DAMY
Ubimara Pereira RODRIGUES
Luziane do C.A.G. CHAGURI
Glauco Bueno MACHADO
Carlos RIGHETTI NETO
Fernando SOGORB SANCHIS

RESUMO: Foram comprovados através de indicadores químicos e biológicos os melhores parâmetros de eficiência na esterilização de materiais usados em biotérios de condições sanitárias definidas. Obtiveram-se resultados satisfatórios em 20 minutos a 121°C para os seguintes materiais: gaiolas de polipropileno; maravalha de madeira em sacos de 5 quilos; ração em camadas de até 10cm; tampas de arame galvanizado; uniformes em pacotes de 15 x 25 x 38cm e em 60 minutos a 121°C para água em garrafas de vidro com 350ml de capacidade. Materiais para isoladores: 30 minutos a 121°C para ração em sacos de 1 quilo e maravalha de madeira em sacos de 1 quilo: 60 minutos a 121°C para água em garrafas de 350ml de capacidade. Houve coincidência (100%) entre indicadores químicos e biológicos o que permite a utilização imediata dos materiais orientando-se pelo controle químico (fusão do enxofre). Não foram avaliadas as variações dos valores nutricionais e organolépticos da ração.

UNITERMOS: *Autoclavagem, biotério, isoladores, indicadores biológicos e químicos*

INTRODUÇÃO

A esterilização pelo calor úmido, apesar de representar um dos métodos mais econômicos, deve ser utilizada com racionalidade em biotérios, devido à quantidade e diversidade de materiais a serem submetidos ao processo. Sua aplicação é fundamental em colônias de animais gnotobióti-

* Trabalho apresentado no 1º Congresso Brasileiro de Animais de Laboratório 29/08 a 2/9/1988, Salvador, Bahia.
Seção de Biotério - Instituto Butantan - C.P. 65 - 01051 - São Paulo - SP - Brasil.
Recebido para publicação em 02/8/1989 e aceito em 27/11/1989.

cos, sendo, mesmo em criações convencionais, indispensável para a qualidade do modelo biológico produzido.

Para Ardouin & Morizet[2], os materiais utilizados podem ser divididos em três grupos: sólidos, líquidos e alimentos, sendo necessário prever para cada grupo processos adequados, compreendendo: eliminação do ar na câmara, entrada de vapor, esterilização, secagem e entrada de ar estéril.

A remoção do ar é o principal fator de sucesso do processo, uma vez que sua presença acarretará pontos frios no interior da massa a ser esterilizada. Para Joslyn[5], das técnicas básicas utilizadas atualmente, a eliminação do ar por pulsos repetidos de vapor intercalados com vácuo, representa a mais eficiente, uma vez que elimina o intervalo de aquecimento entre a massa e a temperatura da câmara.

Na técnica de remoção por alto vácuo, a pressão absoluta do ar na câmara deve ser reduzida a valores de poucos milímetros de mercúrio, antes da admissão do vapor. Um perfeito vácuo é obtido quando atinge uma eliminação de 98%, porém, na prática, alguns autores reportaram resultados satisfatórios com pressão absoluta de 20mm Hg (Knox & Penikett[6] e 50mm Hg Howie et al[4]).

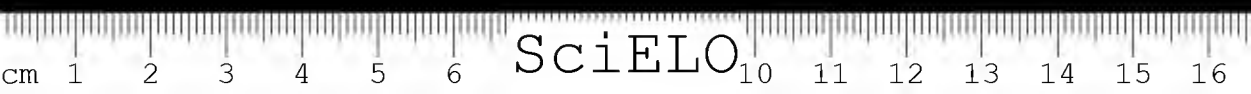
Joslyn[5] apresenta como incoveniente desta última técnica, a desidratação de materiais e o processo de oxidação que sofre o equipamento, provavelmente devido ao vapor superaquecido, provocado pelo ar residual que permanece na câmara, que além de promover o aparecimento de massas superaquecidas, atua como catalisador da reação de oxidação.

Nas etapas seguintes do processo, admissão de vapor e esterilização propriamente dita, para Cristovão & Gotillo[3], é essencial que o vapor se encontre entre duas fases de agregação, a líquida e a gasosa. A mudança de uma fase para outra se faz à custa de grande troca de energia, fornecendo assim requisitos necessários à destruição térmica dos microrganismos.

A qualidade do vapor é fundamental, representando o peso do vapor seco na mistura e a quantidade de água presente. Se a qualidade do vapor for de 97%, significa que a mistura contém 97 partes de água no estado limiar e três no estado líquido. Vapor ideal contém 100% de saturação. A qualidade afeta o grau de esterilização e secagem do material (Joslyn[5]).

Quanto à secagem, o vácuo após esterilização provoca reevaporação de condensados. Segundo Howie et al[4], vácuo de 50mm de Hg garante secagem satisfatória, se houver suplementação de vapor de boa qualidade. A admissão do ar deve ser através de filtros, evitando recontaminação.

Efeitos deletérios provocados pelo calor devem ser considerados, principalmente no que se relaciona a alimentos, desidratação de fibras no caso de uniformes; deformação de gaiolas de polipropileno e oxidação das tampas de metal utilizadas nas gaiolas.

Finalmente, a eficiência do processo poderá ser comprovada por métodos químicos, físicos e biológicos. Para Acker & Anderson[1], três princípios básicos envolvem o processo de validação de esterilidade: demonstração em nível máximo de probabilidade que o processamento e o método estabeleceram esterilidade em todas as unidades do lote; esterilidade no interior do produto; fornecimento de máxima segurança e suporte dos resultados dos testes do produto final esterilizado.

O sucesso da validação está na sistematização dos conhecimentos teóricos na execução do experimento validado e na análise da documentação. O emprego de bioindicadores tem como propósito assegurar que uma redução de sua população será suficiente para destruir toda contaminação viável da massa. (Acker & Anderson[1]).

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer para cada grupo de material os melhores parâmetros de eficiência, comprovados através de indicadores biológicos e químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Autoclave: de dupla porta, forma de paralelepípedo, capacidade $2m^3$, dupla parede, alimentada por vapor de água.

Gaiolas: de polipropileno (homopolímero KM 6.100), medindo 29 x 17,5 x 13cm, com oito extratores laterais e na parte superior da caixa dispositivo para drenagem de água. Colocadas em fileiras horizontais de 28 caixas, totalizando 224 por processo.

Tampas de gaiolas: em arame galvanizado, medindo 30 x 20cm, dispostas em pilhas contendo 10 cada, totalizando 500 tampas por processo.

Maravalha: em sacos multifolhados de papel kraft, grampeados, pesando 5 quilos cada, dispostos nas bandejas superior e inferior, totalizando 20 sacos ou 100 quilos por processo.

Ração: peletizada, na formulação industrial, disposta horizontalmente sobre as bandejas de maneira a formar camadas uniformes de 10cm de espessura no máximo, totalizando 300 quilos por processo.

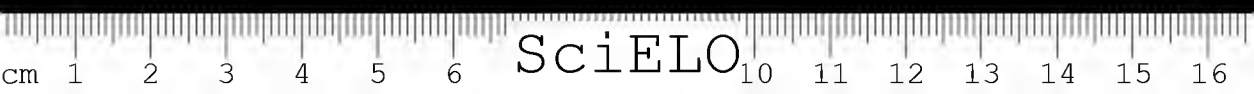
Água: bebedouros de vidro com capacidade de 350ml, colocados em caixas de polipropileno, 24 por caixa, totalizando 336 bebedouros por processo.

Uniformes: pacotes medindo 15 x 38 x 25cm, envoltos em papel kraft.

Material para isoladores: ração e maravalha embalados em saco de algodão, com 1 quilo de capacidade, totalizando 2 quilos por cilindro. Água em bebedouros de 350ml, totalizando 8 por cilindro. Os cilindros são em aço inoxidável, contendo a porção média de seu corpo perfurações, envolvida com 4 camadas de lã de vidro, funcionando como filtro absoluto. A extremidade do cilindro foi fechada com papel celofane duplo.

Indicador químico: ampolas contendo 0,01g de enxofre (Ponto de fusão 119-120°C).

Indicador biológico: ampolas contendo 2 ml de uma suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophillus* (MERCK ATCC 7953), com as seguintes características: n = 1.000 esporos por ml; $D_{120} = 8 \pm 1$ minuto; $D_{121} = 3 \pm 1$ minuto; $D_{122} = 1,5 \pm 1$ minuto; F_{121} = 14 a 15 minutos; z = 4°C.

n = número de microrganismo por unidade de medida, antes do processo de esterilização.

D = tempo de redução (tempo em minutos para que uma determinada temperatura reduza em um décimo o número de esporos capazes de sobreviver).

F = tempo de destruição a 121°C (sob pressão de vapor).

z = inclinação da curva de destruição (diferença de temperatura em graus centígrados, em 1/10 do tempo de ação do calor para alcançar uma destruição de 90%).

Disposição dos indicadores na carga: maravalha, no centro de cada saco; gaiolas, nas extremidades e nas posições medianas de cada fileira; ração, no centro de cada saco; tampas, nas extremidades inferiores, superiores e medianas; água, no centro de cada caixa; uniformes e cilindros, no centro de cada pacote.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada grupo de material se estabeleceu inicialmente a carga máxima para a câmara da autoclave. Iniciou-se a validação de cada processo, com a temperatura de 121°C por 20 minutos. Os resultados das leituras dos indicadores químicos e biológicos foram confrontados e não ocorrendo correlação positiva entre eles, o tempo de esterilização foi aumentado gradualmente, até haver coincidência de resultados. A partir do estabelecimento deste parâmetro, o processo foi repetido 10 vezes para cada grupo. Os resultados estão representados na tabela 1.

Os tempos necessários à esterilização de cadagrupo estão na dependência das características específicas do material, que provoca uma maior ou menor variação entre o tempo do início do patamar de esterilização e o aquecimento do centro da carga.

A água representou o grupo mais difícil no estabelecimento do tempo. Segundo Ardouin & Morizet[2], a variação deste item é grande, ocorrendo principalmente em função do volume dos bebedouros e em menor grau em função do número. O resfriamento requer 50 minutos para diminuir a temperatura de 160 litros, para 100°C e 11 horas para atingir 50°C.

Os resultados indicam que apesar do grau de vácuo registrado pelo manômetro externo de 600 mm Hg, correspondendo à pressão absoluta de 118 mm Hg, ter sido superior à preconizada por Knox & Penikett[6] e Howie et al[4], os dados fornecidos pelos indicadores orientam quanto às condições aproximadas do histórico do processo.

Se por um lado o indicador químico forneceu somente a informação que a temperatrura atingida foi suficiente para provocar sua fusão, o indicador biológico, após 48 horas de incubação a 60°C, forneceu a informação do tempo mínimo que a temperatura se manteve. Na prática a coincidência de 100% verificada, demonstrou ser de valiosa importância, uma vez que permite a introdução de materiais na área protegida com barreira sanitárias, imediatamente após o término de cada processo de esterilização, orientando-se pela fusão do enxofre.

CONCLUSÃO

1. Os indicadores químico (enxofre) e biológico (esporos de *Bacillus stearothermophillus*, utilizados em conjunto, são eficazes na validação e monitoração de processos de esterilização por calor úmido.

DAMY, S.B.; RODRIGUES, U.P.; CHAGURI, L. do C.A.G.; MACHADO, G.B.; RIGHETTI NETO, C.; SO-GORB SANCHIS, F. Esterilização de materiais de biotério pelo calor úmido. **Mem. Inst. Butantan, 52** (1): 5-10, 1990

Tabela 1

Parâmetros validados para materiais utilizados no Biotério Geral do Instituto Butantan, 1989

MATERIAL	VÁCUO		ESTERILIZAÇÃO			SECAGEM		RESFRIAMENTO	RESULTADOS INDICADORES Amostragem		
	Grau de vácuo mm Hg	Pressão absoluta mm Hg	Tempo minuto	Temperatura °C	Pressão mm Hg	Grau de vácuo mm Hg	Tempo minuto	Tempo minuto	Biol.[1]	Quím.[2]	Cont.[3]
MATERIAL UTILIZADO EM ÁREA PROTEGIDA COM BARREIRAS SANITÁRIAS											
ÁGUA	600	118	60	121	775	—	—	960	140 -	140 F	10 +
GAIOLAS	600	118	20	121	775	600	20	20	240 -	240 F	10 +
MARAVALHA	600	118	20	121	775	600	20	20	200 -	200 F	10 +
RAÇÃO	600	118	20	121	775	600	30	30	100 -	100 F	10 +
TAMPAS	600	118	20	121	775	600	20	30	100 -	100 F	10 +
UNIFORMES	600	118	20	121	775	600	30	30	100 -	100 F	10 +
MATERIAL UTILIZADO EM ISOLADORES											
ÁGUA	600	118	60	121	775	600	20	960	10 -	10 F	10 +
MARAVALHA	600	118	30	121	775	600	30	30	10 -	10 F	10 +
RAÇÃO	600	118	30	121	775	600	30	30	10 -	10 F	10 +

1 Sinal negativo para indicador biológico significa que não houve crescimento de esporos, após incubação da suspensão por 48 horas, a 60°C.
2 Sinal F para indicador químico significa que o enxofre fundiu.
3 Controle utilizado para cada processo, constituído de 1 ampola de bioindicador que não sofreu o processo de esterilização.

2. Os melhores parâmetros de eficiência são:

MATERIAL UTILIZADO EM ÁREA PROTEGIDA
COM BARREIRAS SANITÁRIAS

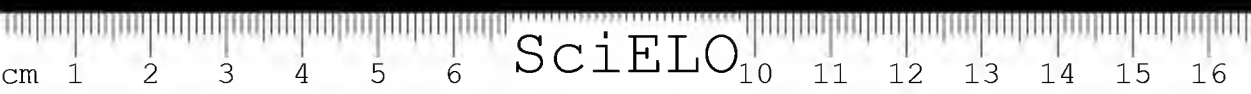
	TEMPO	TEMPERATURA
ÁGUA-bebedouros de 350 ml	60 minutos	121 °C
GAIOLAS — polipropileno	20 minutos	121 °C
MARAVALHA — sacos de 5 quilos	20 minutos	121 °C
RAÇÃO — camadas de até 10 cm	20 minutos	121 °C
TAMPAS	20 minutos	121 °C
UNIFORMES — pacotes de 15 x 25 x 38cm	20 minutos	121 °C

MATERIAL UTILIZADO EM ISOLADORES

ÁGUA — bebedouros de 350ml	60 minutos	121 °C
RAÇÃO — sacos de 1 quilo	30 minutos	121 °C
MARAVALHA — sacos de 1 quilo	30 minutos	121 °C

ABSTRACT: By means of chemical and biologivcal indicators, the best efficiency parameters for the sterilization of material used in laboratory animal house with definite sanitaryconditions were confirmed. Satisfactory results were obtained within 20 min at 121 °C for the following materials: polypropylene cages; wood shavings in 5 kg sacks; diet in layers of up to 10 cm; galvanized wire lids; uniforms in 10 x 25 x 38 cm parcels and within 60 min at 121 °C for water in glass bottles of 350 ml content. Materials for isolators: 30 min at 121 °C for water in bottles of 350 ml capacity. There was a coincidence (100%) between chemical and biological indicators thus allowing the immediate utilization of the material under the orientation of chemical control (fusion of the suylphur). The variations of the nutritional and organoleptic values of the diet were not evaluated.
KEYWORDS: autoclave, laboratory animal houve, isolators, chemical and biological indicators.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKER, M.J. & ANDERSON, N.R. Validation of sterile products. In: LOFTUS, B.T. & NASCH, R.A. ed.*Pharmaceutical process validation*. New York, Marcel Dekker, 1984. p. 29-98.
2. ARDOUIN, P. & MORIZET, J. Du bon usage de l'autoclave dans les unités animales. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, *9*(2):95-104, 1984.
3. CRISTOVÃO, D. A. & GOTILLO, L. Esterilização e desinfecção. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública — USP, 1968. 48p.
4. HOWIE, J. W. et al. Sterilization by steam under increased pressure.*The Lancet*, *1*(7070):425-435, 1959.
5. JOSLYN, L. J. Sterilization by heat. In: BLOCK, S. A. ed. *Disinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p. 3-46.
6. KNOX, R. & PENIKETT, E. J. K. Influence of initial vacuum on steam sterilization of dressings. *Brit. med. J.*, *1*:680-682, 1958.

Mem. Inst. Butantan
52 (1): 11-16, 1990

OCHETOSOMA HETEROCOELIUM (TRAVASSOS, 1921) (TREMATODA: DIGENEA: OCHETOSOMATIDAE) EM NOVO HOSPEDEIRO.

Fernando M. A. CORRÊA *
Rosangela Clara PAULINO *
Marcus A. BUONONATO +
Pedro A. FEDERSONI JR. +

RESUMO: Os autores relatam o primeiro encontro de *Ochetosoma heterocoelium* (Travassos, 1921) em *Bothrops insularis* Amaral, 1921. Além dos aspectos morfológicos do parasita, sua baixa especificidade, o fato do hospedeiro ser nascido em cativeiro, condição em que foi mantido durante toda a sua existência, suas condições naturais de vida e a possível forma de infestação são discutidos.

UNITERMOS: Trematoda: Digenea, *Ochetosoma heterocoelium, Bothrops insularis*.

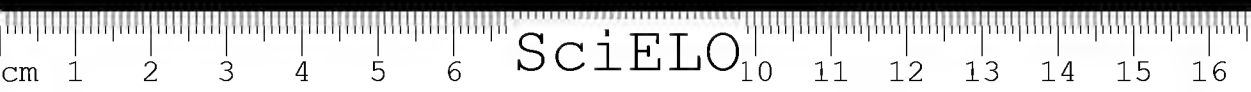
INTRODUÇÃO

Numerosas espécies de trematóides digenéticos são encontradas em ofídios do Brasil, ressaltando Corrêa[2] serem as do gênero *Ochetosoma* as mais freqüentes.

Durante necrópsia de um ofídio *Bothrops insularis* Amaral, 1921, nascido no biotério do Museu do Instituto Butantan em 1985 e morto em 1989, 19 exemplares de Digenea foram encontrados na cavidade bucal e esôfago. Relatamos os resultados desse achado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os parasitos colhidos foram fixados em formol de Railliet & Henry, ligeiramente comprimidos entre duas lâminas de vidro, seguras por um elás-

* Serviço de Parasitologia
+ Museu do Instituto Butantan
Instituto Butantan - C.P. 65 - 01051 - São Paulo - SP - Brasil
Recebido para publicação em 28/12/1989 e aceito em 08/2/1990.

tico delgado; posteriormente, foram corados pelo carmim clorídrico e montados em Eugenol.

O desenho apresentado foi feito com auxílio de câmara clara.

RESULTADOS

As características morfológicas levaram à diagnose genérica de *Ochetosoma* Braun 1911 e suas peculiaridades à identificação com *O. heterocoelium* (Travassos, 1921) conforme pode ser verificado pela comparação entre as figs. 1 e 2.

São digenéticos de tamanho variável, alongados, com ou sem espinhos no tegumento. Acetábulo equatorial e maior que a ventosa oral. Faringe presente. Esôfago curto. Cecos intestinais amplos e curtos, terminando na zona acetabular. Poro genital lateral. Bolsa do cirro enorme e oblíqua. Testículos pós-equatoriais logo atrás do acetábulo; têm zonas coincidentes e campos afastados. Ovário pequeno, redondo, abaixo ou na zona acetabular, no campo dessa ventosa e com zona em contato com a zona dos testículos. Vitelinos constituídos por folículos grossos, laterais, em parte nos campos cecais e testiculares, utrapassando anteriormente a zona acetabular e, posteriormente, a zona testicular. Útero intertesticular e pós-acetabular. Ovos com 0,037 a 0,042 x 0,017 a 0,023 mm.

DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS

A única espécie do gênero *Ochetosoma* reconhecida até agora em serpentes brasileiras é *Ochetosoma heterocoelium* (Travassos, 1921), assinalada no intestino de um exemplar de *Bothrops neuwiedi* (Wagler, 1824).

Em sua descrição original de *Ochetosoma heterocoelium*, confirmada por Travassos, Freitas & Kohn[4], Travassos[3] menciona o intestino como habitat do parasita. Corrêa[2], por sua vez, relata o encontro frequente desse digenético na boca e no esôfago e, só excepcionalmente, no intestino das seguintes espécies de ofídios:

Bothrops cotiara (Gomes, 1913)
Bothrops jararaca (Wied, 1824)
Bothrops moojeni Hoge, 1966
Bothrops neuwiedi mattogrossensis Amaral, 1925
Chironius bicarinatus (Wied, 1820)
Chironius fuscus (Linnaeus, 1758)
Clelia occipitolutea (Dum., Bibr. & Dum., 1854)
Drymarchon corais corais (Boie, 1867)
Erythrolampus aesculapii (L., 1766)
Helicops modestus Gunther, 1861)
Liophis almadensis (Wagler, 1824)
Liophis miliaris (L., 1758)
Liophis poecilogyrus (Wied, 1823)
Liophis reginae (L., 1758)
Liophis typhlus (L., 1758)
Mastigodryas bifossatus (Raddi, 1820)
Philodryas patagoniensis (Girard, 1857)
Waglerophis merremii (Wagler, 1824)

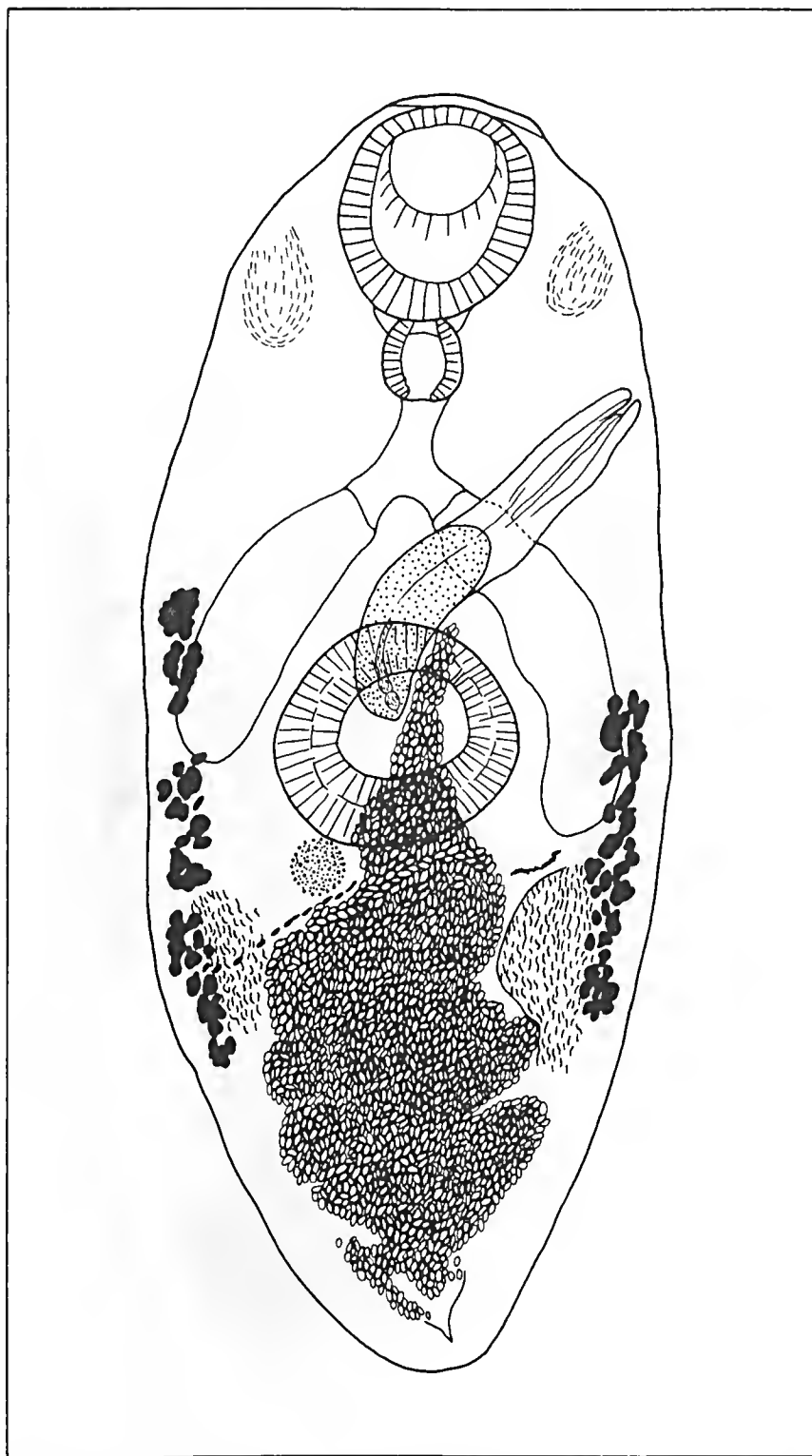



Fig.1 *Ochetosoma heterocoelium* (reproduzido de Travassos, 1921).

CORRÊA, F.M.A.; PAULINO, R.C.; BUONONATO, M.A.; FEDERSONI JR., P.A. **Ochetosoma heterocoelium** (Travassos, 1921) (Trematoda: Digenea: Ochetosomatidae) em novo hospedeiro. **Mem. Inst. Butantan, 52** (1): 11-16, 1990

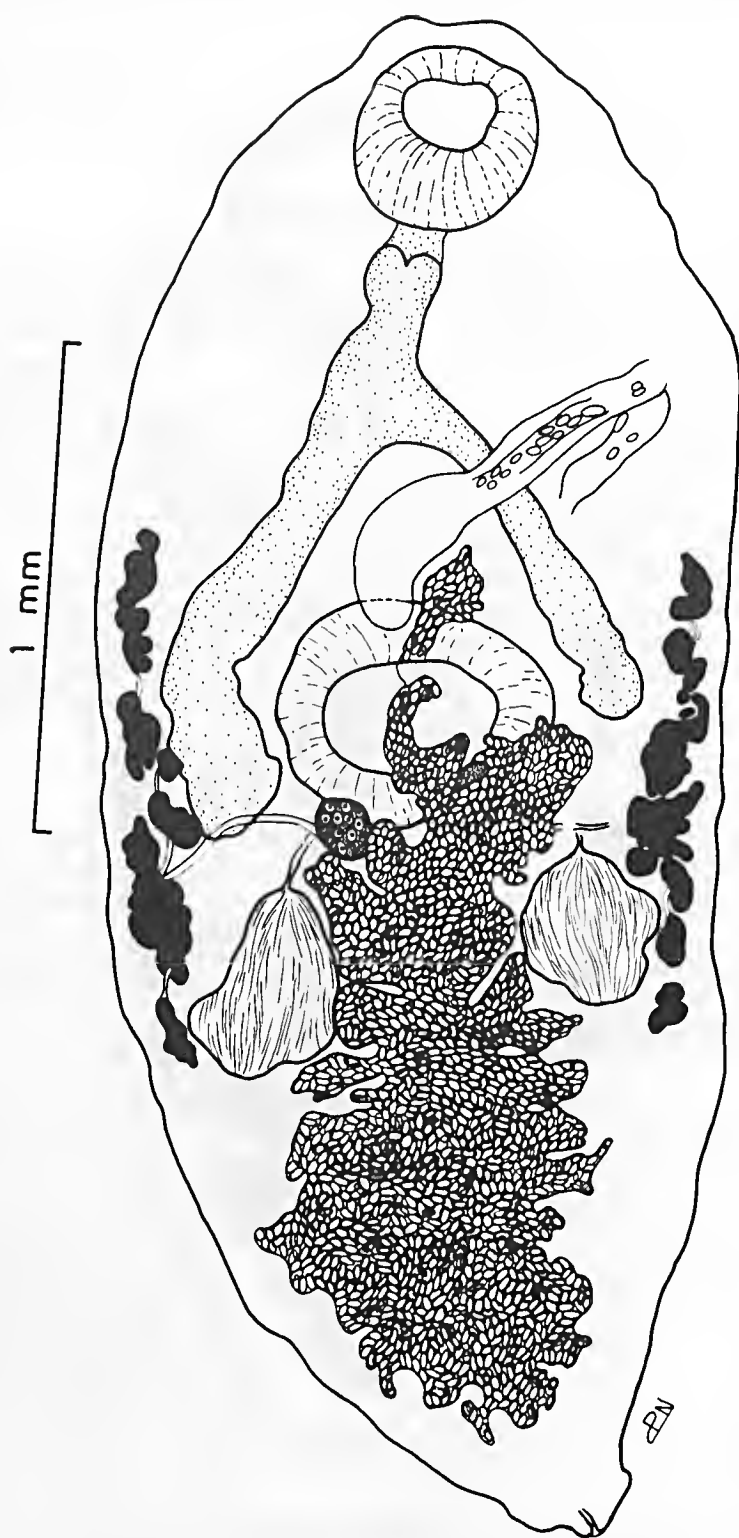



Fig. 2. *Ochetosoma heterocoelium* (original)

Em nossa verificação, os exemplares foram colhidos da boca e do esôfago coincidindo, portanto, com as localizações mencionadas por Corrêa[2]. Nosso achado, todavia, se deu em hospedeiro ainda não catalogado — *Bothrops insularis* Amaral, 1921 e em condições que se destacam por sua peculiaridade.

Tal espécie de ofídio, como é sabido, provém de área geográfica restrita, a Ilha da Queimada Grande, localizada no litoral Sul do Estado de São Paulo conforme as seguintes coordenadas: 24° 28' S e 46° 42' W. Nesse ambiente, totalmente isolado do continente, encontram-se dois tipos de serpentes: *Bothrops insularis* (Viperidae: Crotalinae), conhecida como Jararaca Ilhoa e *Dipsas albifrons cavalheiroi* Hoge, 1950 (Colubridae: Disapinae), conhecida como Dormideira.

Os hábitos da Jararaca Ilhoa são muitos diferentes das *Bothrops* continentais. Não são agressivas, sobem em árvores com extrema facilidade e têm hábitos crepusculares. Apresentam hábitos alimentares dos mais variados, como se pôde comprovar pelo estudo do conteúdo estomacal e por observações no campo, no momento da ingestão. Até o presente foram catalogados como tendo sido ingerido pelas Ilhoas: invertebrados (asas e patas de insetos; diplópodos e lacraias); vertebrados: (anfíbios: *Eleutherodactilus binotatus* (Spix, 1824), répteis: *Dipsas albifrons cavalheiroi* (serpente comedora de moluscos), lagartos do gênero *Mabuya*; e aves: Passeriformes).

O exemplar por nós estudado era um macho, nascido em cativeiro em 07/03/85 e morto em 27/07/89. Durante toda a sua existência foi ele mantido no biotério do Museu do Instituto Butantan, recebendo alimentação o mais semelhante possível àquela encontrada na natureza, sendo certo que em uma ocasião ingeriu uma perereca, Hyla sp.

É provável que o ofídio em questão tenha se infestado através da ingestão do anfíbio. Corrobora nossa hipótese o trabalho de Byrd[1] sobre ciclo evolutivo de *O. aniarum*, parasita de serpentes da America do Norte e que, como a maioria dos trematóides digenéticos, faz uso de 2 hospedeiros intermediários, no caso, um molusco e um girino de anuro.

Infelizmente não tivemos ainda oportunidade de necropsiar exemplares de *Bothrops insularis* recém-chegados da Ilha da Queimada Grande, portanto, nada podemos avançar sobre a fauna parasitológica natural do ofídio.

Por outro lado, é interessante notar que várias espécies de diferentes gêneros de ofídios já foram assinaladas como hospedeiras de *Ochetosoma heterocoelium* o que, sem dúvida, indica baixo grau de especificidade parasitária.

ABSTRACT: The finding of *Ochetosoma heterocoelium* (Travassos, 1921) in *Bothrops insularis* Amaral, 1921 is related. Besides morphological aspects of the parasite, its low specificity, the fact that the host was born and kept in captivity during its entire existence, the natural life conditions of the host and possible mechanisms of infestation are discussed.
KEYWORDS: Trematoda: Digenea. *Ochetosoma heterocoelium. Bothrops insularis.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BYRD, E. E. Life history of Reniferinae parasitic in reptilia of the New Orleans area. *Trans. Am. Microscop. Soc.*, 54: 196-225, 1935.
2. CORRÊA, A. A. S. Fauna de Trematóides parasitos de ofídios da área geográfica brasileira. São Paulo, 1980. Tese — Depto de Parasitologia, ICB, USP.

CORRÊA, F.M.A.; PAULINO, R.C.; BUONONATO, M.A.; FEDERSONI JR., P.A. **Ochetosoma heterocoelium** (Travassos, 1921) (Trematoda: Digenea: Ochetosomatidae) em novo hospedeiro. **Mem. Inst. Butantan, 52** (1): 11-16, 1990

3. TRAVASSOS, L. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. XII. Sobre espécies brasileiras da sub-família Brachycoelinae. *Arq. Esc. Sup. Agric. Med. Vet.* Niterói., 5 (1/2): 59-67, 1921.
4. TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 67: 1-886, 1969. Fascículo único.

Mem. Inst. Butantan
52 (1): 17-23, 1990

CARBON DIOXIDE AS AN AUXILIARY IN THE VENOM EXTRACTION OF *BOTHROPS JARARACA* SNAKES (Viperidae, Crotalinae)

Frederico Fontoura LEINZ*
Thélia R. F. JANEIRO — CINQUINI*
Masaio Mizuno ISHIZUKA**

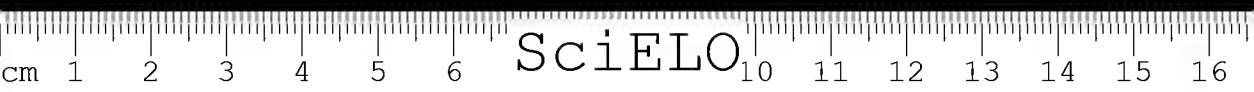
ABSTRACT: Snakes of the species *Bothrops jararaca*, destined for periodical venom extraction, maintained in captivity during the period from November 1988 to April 1989 in the "Seção de Venenos" of the "Instituto Butantan", were separated in two lots: Lot I, composed by 24 snakes extracted under carbon dioxide anaesthesia, and Lot II, composed also by 24 snakes, extracted however without the aid of this gas. The death rate, weight of dry venom individually produced in relation to the weight of snake, dry venom rate in relation to sex, dried venom yield in relation to the length of captivity of both snake lots, was analized. The observations proved that carbon dioxide was efficient and practical as an aid in the venom extraction of *Bothrops jararaca* reducing noticeably the risk of accidents without affecting survival of the snakes and venom production. The rate of dry venom obtained from the females was higher than from the males and the yield of dry venom in relation to the liquid was of 22%. There occurred a small drop of the production in the 2^{nd} month of captivity followed by a gradative increase up to the 6^{th} month.

KEYWORDS: Snakes, venom extraction, carbon dioxide, captivity.

INTRODUCTION

The safe handling of venomous snakes is preoccuping researchers along the last years on account of the high risk of accidents that this operation includes. De Biasi[12] estimates that at the "Instituto Butantan" one accident occurs every 10.000 venom extractions, a number easily reached, since this process is repeated more or less 7.200 times during the year.

* Seção Venenos
** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP
Instituto Butantan - C.P. 65 - 01051 - São Paulo - SP - Brasil
Recebido para publicação em 14.12.1989 e aceito em 13.2.1990

LEINZ, F.F.; JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; ISHIZUKA, M.M. Carbon dioxide as an auxiliary in the venom extraction of **Bothrops jararaca** snakes (Viperidae, Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan, 52** (1): 17-23, 1990

With the aim to reduce the accident rate, is was verified that the most used method for snake contention has been the general anaesthesia, using for this purpose injectables and inhalants substances. The injectable anaesthesics were tested by various authors (Calderwood[9], Brazenor[7], Hinsch and Gandal[17], Karlstrom[21]), the barbiturics being the drug of selection in these cases. When however a great number of venomous snakes is to be handled within a short space of time, this method becomes impracticable, not only by the indispensable handling, but also by the prolonged induction and recuperation. According to Calderwood[9], the induction period due to the low metabolism of these animals, may vary from 5 to 60 min and recuperation from 2 to 48 hs.

The use of inhalants involves less risk for the handler. Depending on the system used for the induction, the animal is introduced into the container with the aid of an appropriate hook, thus restraining the direct handling, practiced only when the snake is anaesthetized.

Ether and chloroform, although already having been employed, are not recommended on account of the delay in induction, prolonged recuperation time, small margin of safety between the anaesthetic and toxic doses, and also by risk of explosion (Brazenor and Kaye[7], Kaplan and Taylor[19], Stecher[26].

Volatile liquids as Halothane and its by products are the substances currently more used as inhalant anaesthesics. Depending on the species, induction and recuperation are prompt and only a few deaths are mentioned in consequence of their use. However, when many animals are to be handled, its use is limited by the necessity to supplement oxygen during the induction and by eventual post-anaesthesic care, that would complicate the process(Kaplan[20], Calderwood[9].

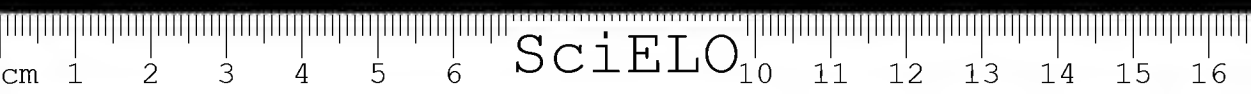
Ishii and Noburu[18] used carbon dioxide as anaesthesic in carrying out surgery in *Trimeresurus flavoviridis*. Based on this methodology, De Biasi[12] observed a lot of 28 snakes *Bothrops moojeni*, extracted with the help of this gas, and concluded that the method besides propiciating a higher protection to the extractor, prevents loss of venom when aggressive animals are handled.

At the moment, the venom extraction of all the snake species maintained at the ''Seção de Venenos'' are done with the aid of carbon dioxide, with the purpose to diminish the risk of accidents.

Since there exists a marked variation in sensibility of the species to anaesthesic drugs (Gans, in Burke and Wall[8]), it is attempted to determine the mortality rate, weight of dry venom individually produced in relation to the weight of the snake, dry venom rate in relation to sex, dried venom yield in relation to the liquid venom, and dried venom weight obtained in relation to the lenght of captivity, when two groups of *Bothrops jararaca* were extracted with and without the use of carbon dioxide as anaesthesic.

MATERIAL AND METHODS

Snakes: A total of 48 snakes *Bothrops jararaca*, were extracted at the ''Seção de Venenos'' of the ''Instituto Butantan'' during the period of November 1988 to April 1989. On receiving them from nature, they were treated against ecto and endo-parasites, maintained in quarantine for 21 days, then placed into rooms destined for maintenance. Veterinary medi-

cal care was available from the admission up to the conclusion of the experiment. The snakes that died were submitted to necropsy.

Maintenance: The snakes were individually maintained in wooden boxes, lined with corrugated cardboard, 50cm in lenght, 40cm in width and 25cm in height, within rooms with the enviromental temperature varying from a minimum of 19°C to a maximum of 30°C. No control of humidity was done, and the enviroment was kept under artificial light of fluorescent type for 8 hs per day. The cleaning of the boxes was done always as soon as the animal defecated, and once a month, all boxes were substituted by clean and desinfected boxes. The substitution of boxes was accompained by a general desinfection of the rooms.

Alimentation: Adult albinic mice *Mus musculus* were given 7 days after venom extraction, with variable acceptance of the food. Water was daily exchanged and maintained at disposal of the animals in earthen jugs, washed and desinfected every second day.

Venom extraction: At first, two lots were set up: Lot I, composed by 24 snakes, i.e., 18 females and 6 males, extracted with the aid of carbon dioxide anaesthesic. The induction followed the process described by De Biasi[12], however individually applied and not in groups. The anaesthetized animal was considered ready for extraction when it showed itself immobilized, thus impeded to make aggressive movements. Lot II, constituted also by 24 snakes, 3 males and 21 females, extracted without the help of carbon dioxide. The interval between the extractions was 28 days for both lots. The manual extraction method described by Belluomini[5] was habitally used in the ''Seção de Venenos''.

Attainment, weighing and drying of the venom: The venom was collected on individual plates weighed on an analytical precision balance, and then vaccum dessicated in a container with calcium chloride for 24 hs, then again wheighed to determine the dry weight.

Statistical analysis: The test of the difference between two ratios with normal approach (Z) and the test ''t-Student'' wete done. The rejection level of the nullity hypothesis was established as 0,05.

RESULTS

During the realization of the experiment, 4 deaths were verified in Lot I, submitted to anaesthesia with carbon dioxide and 2 deaths in Lot II, not submitted to the action of the gas. Based on these results, the test of Two Proportions with normal approximation was applied, obtaining the value of $Z = 0{,}88$. This value showed that there was no significance in the number of deaths in both lots the adopted 5% level of rejection, during the the 6 months of observation. The results of the necropsies of the snakes that died, are found in Table 1.

Table 1

Bothrops jararaca maintained in captivity, causa mortis and treatment.

Treatment Causa mortis	With gas	Without gas
PNEUMOENTERITIS	1	2
GASTROENTERITIS	2	—
NDN*	1	—

* NDN = nothing to note

For calculation, the dried venom production was standardized on account of the very great variation of the snakes' weight. Thus there was obtained, during the 6 months duration of the experiment, a mean production of 0,3 mg dried venom per weight (g) of the snake that produced the venom. Table 2

Table 2

Mean values of the dry venom rate (*) according to treatment and venom extraction of *Bothrops jararaca* in captivity

Extraction Treatment	1º	2º	3º	4º	5º	6º
WITH GAS	0,330 ± 0,152	0,296 ± 0,081	0,300 ± 0,121	0,311 ± 0,124	0,322 ± 0,111	0,367 ± 0,159
WITHOUT GAS	0,350 ± 0,147	0,283 ± 0,105	0,300 ± 0,110	0,343 ± 0,147	0,357 ± 0,116	0,371 ± 0,115

* Weight of dry venom (mg) per weight of the snake (g)

When the dried venom rate produced in relation to sex was compared, a significant difference was observed between both, the production of females being larger than that of the males (t = 10,0) for the two lots.

The mean yield of dry venom in relation to the liquid venom in both groups was 22,8%.

An analysis of successive extractions disclosed a drop in the venom production during the 2nd month of extraction, when compared with the 1st month. Afterwards, there was a gradative increase up to 6th month, when the dry venom production became larger than that of the 1st month of extraction. Table 2

The mean period of induction was 3 min and that of recuperation, 8 min.

DISCUSSION

The observation showed that the carbon dioxide was efficient as anaesthetics when a rapid induction and recuperation is desired. It is a prac-

tical method to eliminate aggressive movements of the snakes, diminishing radically the risk of accidents. Therefore it is well qualified for the necessities of the "Seção de Venenos", where many snakes are handled within a short time interval.

In relation to the mortality, althought the death rate occurring in both groups is not significant, an index of 16,7% of deaths was verified in the lot submitted to CO_2, and 8,3% in the lot not submitted to the gas. This index may be considered low, since the animals were monthly submitted to the trauma provoked by venom extraction (Cowan)[11]. Belluomini[4], cites a death rate of 81,7% for *Bothrops jararaca* maintained in captivity at the "Instituto Butantan" during 1963. For the 5 months duration of the experiment developed by De Biasi[12], the death rate of *Bothrops moojeni* reached and index of 50%. This difference may be atributed to a higher sensibility of the species, to the changes recently introduced in the management and mainly to the methodology adopted by the author, where the animals were anaesthetized in groups, thus difficulting the observation.

The two method used for the contention of the snakes, led us to analize the individual production of venom in both groups. The mean weight of the obtained dry substance maintained itself constant for both groups, corroborating the observations of several authors (Amaral[1], Klauber[22]) who affirmed that there exists a direct connection between the size of the snake and the production of venom. In *Bothrops jararaca*, the females produced more dry matter, not only because they are naturally larger and heavier, but also because the show proportionally to their weight, a higher rate of dry matter, when compared with the males, corroborating the observation of Deoras[13].

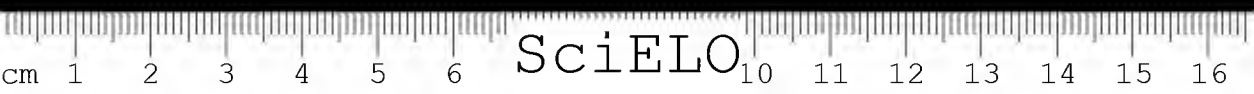
Snakes maintained in captivity, according to Klauber[22] and Belluomini[3], present a drop in the venom production in the succeeding extractions. Other authors (Wolf[28], Kochva[23], do not admit this phenomenon, continuing stable the production. The analysis of the successive extractions of *Bothrops jararaca*, either submitted or not to carbon dioxide, disclosed an abrupt drop in the 2nd extraction, when compared to the 1st, and soon after an increase of the produced dried venom rate. According to Snyder[24], adaptation to an enviroment other than the natural constitues itself in stress, when there may occur fat consumption in order to maintain the inner equilibrium of the animal, to an immediate detriment to the vital functions. The variation in the dry venom weight obtained in this phase, perhaps occurred in consequence of an adaptation period of the animal to captivity.

CONCLUSIONS

1 — The carbon dioxide proved to be practical and efficient for the venom extraction of *Bothrops jararaca* diminishing noticeably the risk of accidents without affecting the survival of the animals and the venom production.

2 — Females produced more dried venom proportionally to their body weight then the males.

3 — During the adaptation period to captivity, a drop in venom production was observed.

LEINZ, F.F.; JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; ISHIZUKA, M.M. Carbon dioxide as an auxiliary in the venom extraction of **Bothrops jararaca** snakes (Viperidae, Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan, 52** (1): 17-23, 1990

RESUMO: Serpentes *Bothrops jararaca* destinadas à extração periódica de veneno e mantidas em cativeiro no período de novembro de 1988 a abril de 1989, na Seção de Venenos do Instituto Butantan, foram divididas em dois lotes: Lote I, composto de 24 serpentes extraídas com o auxílio do dióxido de carbono como anestésico, e Lote II, constituído também de 24 serpentes extraídas porém sem o auxílio deste gás. Foram analisados os índices de mortalidade, o pêso de veneno sêco produzido individualmente, a taxa de veneno sêco em relação ao líquido e o pêso do veneno sêco obtido em relação ao tempo de cativeiro das serpentes de ambos os lotes. As observações demonstraram que o dióxido de carbono foi eficiente como auxiliar na extração de veneno de *Bothrops jararaca*, diminuindo sensivelmente o risco de acidentes sem afetar a sobrevida dos animais e a produção. A taxa de veneno sêco obtido das fêmeas foi maior que a dos machos, e o rendimento de matéria seca em relação à líquida foi de 22,8%. Ocorreu uma pequena queda na produção no 2º mês de cativeiro e em seguida houve um gradativo aumento até o 6º mês.

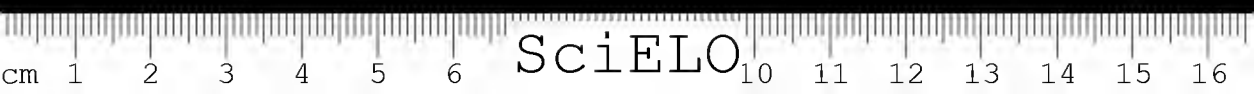
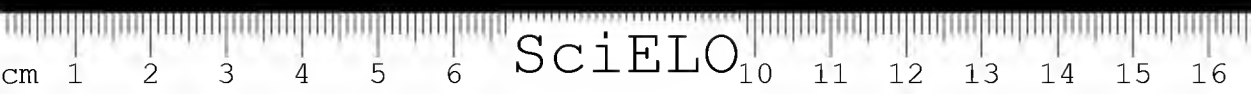
UNITERMOS: Serpentes, extração de veneno, dióxido de carbono, cativeiro.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the technicians Zilma L. da Silva e Pedro N.M. Cerveira for the meticulous weighing and extraction of the venom.

REFERENCES

1. AMARAL, A. Improved process of venom extraction. *Bull. antiv. Inst. America, 1*: 100-102, 1928.
2. AMARAL, A. Studies on snake venoms. I-Amounts of venom secreted by Neartic Pit Vipers. *Bull. antiv. Inst. America, 1*: 103-104, 1928.
3. BELLUOMINI, H. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, *31*(4): 149-154, 1964.
4. BELLUOMINI, H. Venom production of snakes in captivity. Mem. *Inst. Butantan, 32*: 79-88, 1965.
5. BELLUOMINI, H. Extraction and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. In: BUCHERL, W., ed. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, v. 1, p. 9-117, 1968.
6. BETZ, T.W. Surgical anesthesia in reptiles, with special reference to the water snake *Natrix rhombifera. Copeia, 2*: 284-287, 1962.
7. BRAZENOR, C.W. & KAYE, G. Anesthesia for reptiles. *Copeia, 3*: 165-170, 1953.
8. BURKE, T.J. & WALL, B.E. Anesthetic deaths in cobras *Naja naja* and *Ophiophagus hannah* with Methoxyflurane. *JAVMA, 157* (5): 620-621, 1970.
9. CALDERWOOD, H.W. Anesthesia for reptiles. *JAVMA, 159*(11): 1618-1627, 1971.
10. CALOW, P. Ecology, evolution and energetics; a study in metabolic adaptation. In: MCFAYDEN, A., ed. *Adv. Ecological Res. 10*: 1-62, 1977.
11. COWAN, D.E. Adaptation, maladaptation and disease. In: MURPHY, J.B. *Reproductive biology and diseases of captive reptiles*. Lawrence, Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1980. p. 191-6.
12. DE BIASI, P.; BELLUOMINI, H.E.; HOGE, A.R.; PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*: 167-172, 1976/77.
13. DEORAS, P.J. Probable significance of venom Yield record studies. *Mem. Inst. Butantan, 33*(3): 767-774, 1966.
14. FRYE, F.L. Husbandry, medicine and surgery in captive reptiles. Kansas, V.M. Publishing, Bonner Springs, 1973. p. 112-126.
15. GANS, C. *Biology of the reptilia*. London, Academic Press, 1976. V.5.

16. HACKENBROCK, C.R. & FINSTER, M. Fluothane; a rapid and safe inhalation anestesic for poisonous snakes. *Copeia, 2*: 440-441, 1963.
17. HINSCH, H. & GANDALL, C.P. The effects of Etorphine (M99) Oxymorphone Hydrocloride and Meperidine Hydrocloride in reptiles. *Copeia, 2*: 404-405, 1969.
18. ISHII, A. & NOBURU, Y. Eletrocoagulation of the venom duct of Habu, *Trimeresurus flavoviridis* under carbon dioxide anaesthesia. *The Snake*, 3: 35-38, 1971.
19. KAPLAN, H.M. & TAYLOR, R. Anesthesia in turtles. *Herpetologica, 13*: 43, 1957.
20. KAPLAN, H.M. Anesthesia in amphibians and reptiles. *Fed. Proc., 28*: 1541-1546, 1969.
21. KARLSTROM, E.L. & COOK JR., S.F. Notes on snake anesthesia. *Copeia, 1*: 57-58, 1955.
22. KLAUBER, L.M. Rattlesnakes; their habits, life histories and influence on mankind. Berkeley, Univ. of California, 1956.
23. KOCHVA, E. A Quantitative study of venom secretion by *Vipera palestina. Am. J. Trop. Med. Hyg., 9*: 381-390, 1960.
24. SNYDER, R.L. *The biology of population Grwth. St.* New York, Martin Press, 1976.
25. STADELMAN, R.E. Some venom extraction records. *Bull. antiv. Inst. America, 3*(1):29, 1929.
26. STECHER, P.G., ed. *The Merck Index*. 8 ed. New Jersey, Merck Rahway, 1968.
27. VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. São Paulo, Campus, 1988. 294 p.
28. WOLFF, N.C. & GITHENS, T.S. Yield and toxicity of venom from snakes extracted over a period of two years. *Copeia, 4: 234, 1939.*

Mem. Inst. Butantan
52 (1): 25-31, 1990

MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL DE *BOTHROPS ALTERNATUS* DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854, (OPHIDIA, VIPERIDAE) EN LABORATORIO

Flavio FRANCINI
Fabio O. PELUSO
Carlos S. GRISOLIA*

RESUMEN: El presente trabajo tiene por objeto dar a conocer un método para la identificación individual de *Bothrops alternatus* en laboratorio, basado en el diseño de la región cefálica. Este método permite la fácil individualización del ofidio sin necesidad de manipuleo, evitando el riesgo del operador y reduciendo el stress del animal.

UNITERMOS: Ophidia. Bothrops alternatus. Identificación. Diseño cefálico.

INTRODUCCIÓN

El Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (LYMAV) cuenta con un lote de aproximadamente 40 ejemplares vivos de *Bothrops alternatus*, alojados en cajas individuales, las cuales poseen un número de registro permitiendo de ese modo identificarlos con precisión[8]. Periodicamente, estos ejemplares son sometidos a estudios que requieren su agrupación en un mismo ambiente, con lo cual este sistema identificatorio basado en características no ligadas directamente con el animal, resulta ineficaz. Dado el interés en disponer de un método que permita el reconocimiento individual de los mismos una vez agrupados, surge la necesidad de contar con alguna técnica de identificación precisa. En ese marco hemos ensayado numerosos procedimientos tales como la inyección subcutánea de tinta

---

* Laboratório y Museo de Animales Venenosos
Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de La Plata.
Calles 60 y 120 — 1900 — La Plata — Argentina.
Recebido para publicação em 26/7/1989 e aceito em 19/2/1990.

china[7,14,15], cortes de escamas ventrales[4,5], aplicación de marcas tipo ganado como el marcado ''a fuego'' o la fijación de etiqueta (tags)[9,11,12], sin haberse obtenido resultados satisfactorios.

Así aparece el uso del método basado en el diseño cefálico de líneas o bandas, como solución al problema planteado. Dicho carácter aparenta ser de variación individual[2] y de fácil observación directa sin necesidad de manipuleo de los ejemplares, minimizando los riesgos del operador y los factores de stress del animal. Cabe destacar al respecto, el reciente trabajo de Sazima[13] donde utiliza las variaciones del diseño a lo largo del cuerpo en *Bothrops jararaca*, como ''marca natural que permite diferenciar a los individuos entre si''. Por otro lado, Carlstrom y Edelstam[6], usando el patrón de coloración tegumentario en *Natrix natrix* para su individualización, llegan a la conclusión de que el sistema es tan seguro como el método de las huellas dactilares usado por la policía.

MATERIAL Y MÉTODO

Se graficaron y fotografiaron 94 ejemplares vivos y formolizados, de diferentes edades y sexo, pertenecientes al serpentario y colección del LYMAV. En cada ejemplar se pueden reconocer tres elementos fundamentales en el diseño dorsal de la región cefálica, a modo de líneas claras sobre fondo oscuro:

a) Una línea transversal al eje de la cabeza y entre los ojos, a la que denominamos ''Línea Interocular'';

b) Una línea paralela al eje del cuerpo más o menos coincidente con el plano de simetría de la cabeza, desde la Línea Interocular hacia atrás, y que llamamos ''Línea Medial'';

c)''Líneas Lateromediales'', que tienen una posición más o menos coincidentes con la ubicación del hueso cuadrado, y que van de la región posterolateral de la cabeza hacia adelante y al centro de ésta, hasta converger sobre la Línea Medial, dividiéndola en ''Línea Medial Anterior'' y ''Línea Medial Posterior''.

A este esquema se le agregan elementos accesorios tales como las ''Líneas Marginales'', que se extienden a ambos lados de la cabeza, desde la región postorbitaria hacia atrás sobre el borde de aquella hasta aproximadamente la comisura de la boca; y la ''Línea Rostral'', que va desde el margen anterior de un ojo al otro por el borde anterior de la cabeza (Fig. 1).

RESULTADOS

A partir de las diferencias en las relaciones entre estos elementos, se han podido reconocer cuatro patrones básicos que sirvieron como punto de partida para la confección de un sistema de clave aplicable al lote (Fig. 2).

Dentro de cada uno de estos patrones se observan variaciones individuales tales como largo y ancho diferencial de las líneas, presencia secundaria de expansiones, abultamientos y/o incisiones, y grado de rectitud o curvatura de los elementos mayores, lo suficientemente amplias como para permitir la identificación de un ejemplar problema integrante del lote (Fig.3).

De acuerdo al material estudiado, no se constató variación en el diseño de cada ejemplar a lo largo del tiempo de observación (dos años), aun después de las sucesivas mudas.

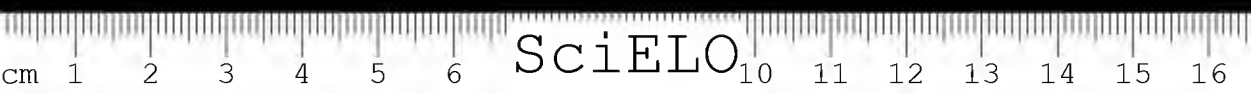
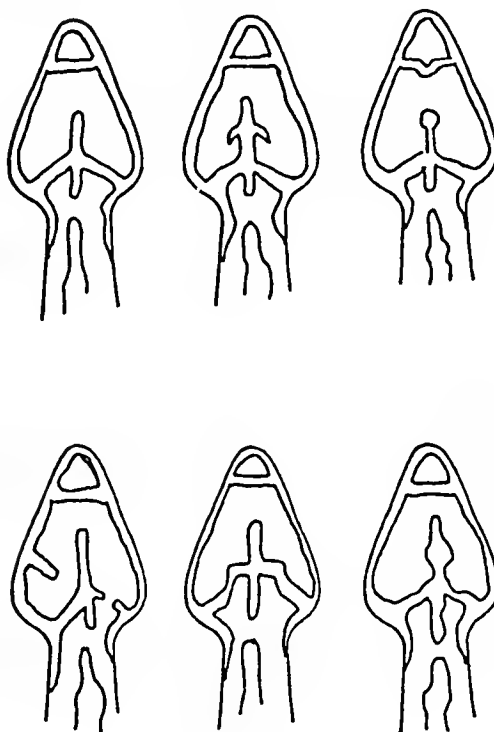
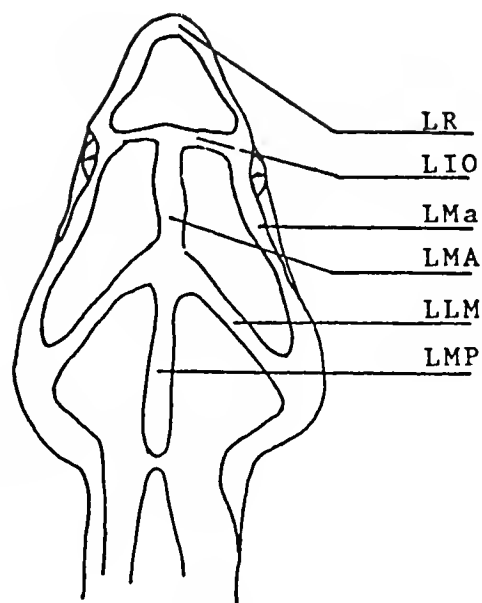
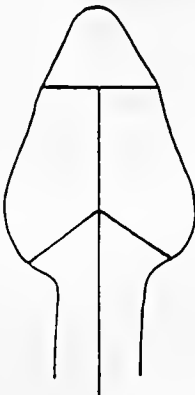



FIG. 1. — Esquema de la relación entre las líneas del diseño de la región cefálica. LR, Línea Rostral; LIO Línea Interocular; LMa, Línea Marginal; LMA, Línea Medial Anterior; LLM, Línea Lateromedial; LMP Línea Medial Posterior.

FIG. 3. — Variaciones individuales dentro de un mismo patrón.

FRANCINI, F.; PELUSO, F.O.; GRISOLIA, C.S. Método para la identificación individual de Bothrops alternatus Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (Ophidia, Viperidae) en laboratorio. Mem. Inst. Butantan, 52 (1): 25-31, 1990

PATRONES BASICOS **SUBPATRONES**

A- LMA y LMP contínuas. La primera contacta con la LIO.

a.- LIO recta.

b.- LIO cóncava hacia adelante

c.- LIO cóncava hacia atrás.

B- LMA y LMP contínuas. La primera separada de la LIO.

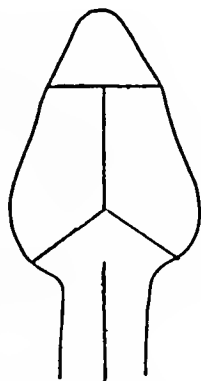
a.- LIO recta.

b.- LIO cóncava hacia adelante.

c.- LIO cóncava hacia atrás.

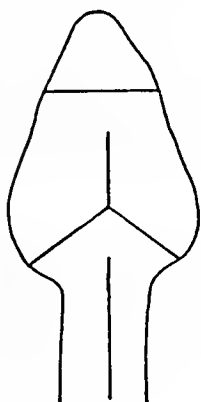
FIG. 2. — Clave diseñada para el análisis de los componentes del lote. (referencias, idem Fig. 1)

PATRONES BASICOS SUBPATRONES

C- LMA y LMP separadas. La primera contacta con la LIO.

a.- LIO recta.

b.- LIO cóncava hacia adelante.

c.- LIO cóncava hacia atrás.

D- LMA y LMP separadas. La primera separada de la LIO.

a.- LIO recta.

b.- LIO cóncava hacia adelante.

c.- LIO cóncava hacia atrás.

FIG. 2. — Clave diseñada para el análisis de los componentes del lote. (referencias, idem Fig. 1)

Por otro lado, se analizó la relación entre el patrón de diseño y el sexo del animal no encontrándose correlación alguna.

También se analizaron los diseños cefálicos de un lote compuesto por 20 crías procedentes de la misma madre. En éstas no se observó identidad entre el patrón materno y el de la progenie; incluso se verificó en éstas la presencia de patrones diferentes entre sí.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Según lo expresado por Lewke y Stroud[10], un buen método de marcado debe cumplir las siguientes condiciones: causar el menor daño y stress posible al animal, no inhibir el normal movimiento o muda del mismo, ser perdurable en el tiempo, de fácil lectura, adaptable a distintas tallas de animales, que pueda ser usado tanto a campo como en laboratorio, asi como requerir equipo y materiales de fácil obtención o bajo costo.

El método de identificación individual de *Bothrops alternatus* basado en el diseño cefálico se ajusta en gran medida a los criterios arriba mencionados; y ha resultado ser eficaz aplicado al manejo de los ejemplares del LYMAV, para separarlos en los casos de mezcla accidental o de agrupamientos con fines científicos o de transporte.

Dada la cantidad de individuos examinados, no sabemos si el método puede aplicarse con igual exactitud a lotes mayores, e incluso, siendo aplicable, habría que evaluar su practicidad. De resultar ésto así podría usarse para estudios poblacionales a campo a través de la técnica captura — identificación — recaptura, tal como lo realizado por Sazima[13] en su trabajo.

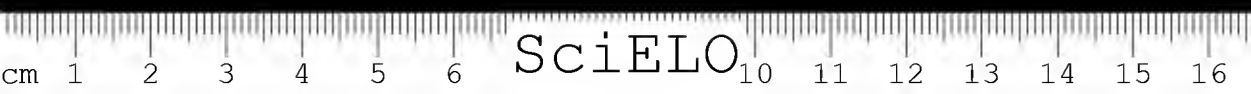
Una metodología similar está siendo intentada sobre un lote de 50 ejemplares de *Bothrops neuwiedi*. Esta especie posee un diseño cefálico de manchas oscuras sobre fondo castaño claro, aparentemente de variación individual[1, 3]. Aún ésto, las manchas se presentan en forma muy irregular, algunas incluso, con sus bordes esfumados, ausentes de definición. Todo ésto hace difícil la determinación de patrones que permitan el agrupamiento de los ejemplares para sistematizar su identificación. Debemos sumar a ésto el carácter particularmente agresivo de esta especie lo que complica la visualización y discernimiento del diseño cefálico. Por lo señalado podemos decir que el método aplicado a *B. neuwiedi* no posee la misma practicidad que para *B. alternatus.*

ABSTRACT: The aim of this paper is to show a method that allows the individual identification of *Bothrops alternatus* in the laboratory, based on the pattern of the cephalic region. The method allows an easy identification of the snake without handling, avoiding risk for the worker and reducing the snake's stress.

KEYWORDS: Ophidia, Bothrops alternatus, Identification, Pattern cephalic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABALOS, J.W. & BAEZ, E.C. Variaciones del diseño en *Bothrops neuwiedii meridionalis* de Santiago del Estero. *Acta Zool. Lilloana, 19*:479-486, 1963.
2. AMARAL, A. do. Estudos sobre ofídios neotrópicos. XXXI. Sobre a espécie *Bothrops alternatus* D y B., 1854 (Crotalidae) Variações. Redescripção. *Mem. Inst. Butantan, 8*: 161-182, 1933/34.

3. ___________. *Serpentes do Brasil; iconografia colorida*. São Paulo, Melhoramentos/EDUSP, 1977. 248 p.
4. BLANCHARD, F.N. & FINSTER, E.V. A method of marking living snakes for future recognition, with a discussion of some problems and results. *Ecology, 14*:334-347, 1933.
5. BROWN, W.S. & PARKER, W.S. A ventral scale clipping system for permanently marking snakes (Reptilia, Serpentes). *J. Herpetol, 10*: 247-249, 1976.
6. CARLSTROM, D. & EDELSTAM, C. Method of marking reptiles for identification after recapture. *Nature, 158*:748-749, 1946.
7. CLARK JR, D.R. Branding as a method marking technique for amphibians and reptiles. *Copeia*: 148-151, 1971.
8. CRISOLIA, C.S.; PELUSO, F.O.; STANCHI, N.O. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. *Rev. Arg. Prod. Animal, 6*(7/8):517-519, 1986.
9. HIRTH, H.G. Weight changes and mortality of three species of snakes during hibernation. *Herpetologica, 22*:8-12, 1966.
10. LEWKE, R.E. & STROUD, R.K. Freeze branding as a method of marking snakes. *Copeia*: 997-1000, 1974.
11. PENDLEBURY, G.B. Tagging and remote identification of rattlesnakes. *Herpetologica, 28*:349-350, 1972.
12. POUGH, F.H. A quick method for permanently marking snakes and turtles. *Herpetologica, 26*:428-430, 1970.
13. SAZIMA, I. Um estudo de biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. *Mem. Inst. Butantan, 50*(3):83-99, 1988.
14. WEARY, G.C. An improved method of marking snakes. *Copeia*:854-855, 1969
15. WOODBURY, A.M. Uses of marking animals in ecological studies; marking amphibians and reptiles. *Ecology,37*:670-674, 1956.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês)
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.